6 月 June
2020, 63(6): 727 – 734
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: //www. insect. org. cn
doi: 10.16380/j. kcxb. 2020. 06. 008

家蚕微孢子虫海藻糖酶3的表达、定位及功能

张轶岭，李俊昊，宁嘉兴，Bismark KYEI，沈中元*

（江苏科技大学生物技术学院，江苏镇江 212018）

摘要：【目的】本研究旨在初步明确家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis* 海藻糖酶3（NbTre3）的功能，为家蚕 *Bombyx mori* 微粒子病的防治提供理论依据和线索。【方法】通过 PCR 扩增 *NbTre*3，构建原核表达载体 pET28a-*NbTre*3；经 IPTG 诱导在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中表达重组蛋白 NbTre3，Western blot 检测目的蛋白；Ni 柱亲和层析法对重组蛋白 NbTre3 进行纯化，用获得的 NbTre3 免疫新西兰兔制备多克隆抗体；利用间接免疫荧光技术对成熟家蚕微孢子虫中的 NbTre3 进行定位；qRT-PCR 检测家蚕微孢子虫感染家蚕5龄起蚕后不同时间中肠中 *NbTre*3 的转录水平；通过分别注射 siRNA-1，siRNA-2 和 siRNA-3 进行 RNAi，qRT-PCR 检测 RNAi 后不同时间感染家蚕微孢子虫的家蚕5龄起蚕中肠中 *NbTre*3 和 16S rRNA 的转录水平。【结果】成功纯化并获得重组目的蛋白 NbTre3，大小约为 34 kD。免疫新西兰兔后，收集血清，纯化获得 NbTre3 多克隆抗体，经 Western blot 鉴定正确。间接免疫荧光结果显示 NbTre3 主要分布在成熟家蚕微孢子虫孢原质中。qRT-PCR 结果表明，家蚕微孢子虫感染后 6 h 时家蚕5龄起蚕中肠中 *NbTre*3 的表达量最高；siRNA 抑制 *NbTre*3 的表达后，家蚕微孢子虫 16S rRNA 的转录水平没有明显的变化。【结论】结果提示 NbTre3 可能在家蚕微孢子虫感染初期的发芽过程中发挥重要的作用。

关键词：家蚕微孢子虫；海藻糖酶；原核表达；RNA 干扰；qRT-PCR

中图分类号：Q965.8　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2020)06-0727-08

Expression, localization and function of trehalase 3 in *Nosema bombycis* (Microsporidia)

ZHANG Yi-Ling, LI Jun-Hao, NING Jia-Xing, Bismark KYEI, SHEN Zhong-Yuan* (College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China)

Abstract: 【Aim】 The purpose of this study is to preliminarily clarify the function of trehalase 3 (NbTre3) in *Nosema bombycis*, so as to provide theoretical basis and clues for the prevention and treatment of pebrine disease of *Bombyx mori*. 【Methods】 *NbTre*3 was amplified by PCR, and the prokaryotic expression vector pET28a-*NbTre*3 was constructed. The recombinant protein NbTre3 was expressed in *Escherichia coli* with IPTG induction and identified by Western blot. The recombinant protein NbTre3 was purified via Ni column affinity chromatography, and the polyclonal antibody was prepared by immunizing New Zealand rabbits with the obtained NbTre3. The localization of NbTre3 in mature spore of *N. bombycis* was investigated by indirect immunofluorescence assay. After *N. bombycis* infected the 5th instar larvae of *B. mori*, the transcription levels of *NbTre*3 in the midgut at different post-infection time were detected by qRT-PCR. The RNAi was carried out by injection of siRNA-1, siRNA-2 and siRNA-3, respectively, and the transcription levels of *NbTre*3 and 16S rRNA in the midgut of the 5th instar larvae of *B. mori* infected by *N. bombycis* at different time post RNAi were detected by qRT-PCR.

基金项目：江苏省自然科学基金项目（BK20160364）；现代农业产业技术体系建设专项（CARS-18）
作者简介：张轶岭，女，1986年3月生，河北邢台人，博士研究生，研究方向为家蚕病理及分子生物学，E-mail：zhangyiling008@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: szysri@163.com
收稿日期 Received: 2019-10-09；接受日期 Accepted: 2020-03-24

【Results】The recombinant target protein NbTre3 was successfully expressed in *E. coli* and purified, with a size of about 34 kD. After immunizing the New Zealand rabbits, the serum was collected, and the polyclonal antibody of NbTre3 was obtained by purification and verified by Western blot. Indirect immunofluorescence result showed that NbTre3 was mainly distributed in the sporoplasm in mature spores of *N. bombycis*. The qRT-PCR results showed that the expression level of *NbTre*3 in the midgut of the 5th instar larvae of *B. mori* was the highest at 6 h post infection of *N. bombycis*. After the expression of *NbTre*3 was inhibited by siRNA, there was no significant change in the transcription level of 16S rRNA of *N. bombycis*. 【Conclusion】The results suggest that NbTre3 may play an important role in the germinating process of the initial infection of *N. bombycis*.

Key words: *Nosema bombycis*; trehalase; prokaryotic expression; RNA interference; qRT-PCR

微孢子虫(microsporidia)是一类专性细胞内寄生的单细胞真核生物(Becnel *et al*., 2005; 刘吉平和曾玲, 2006),寄主范围非常广泛,可感染从无脊椎动物到脊椎动物的几乎所有动物类群(Mathis, 2000)。目前已经发现超过 1 500 种,归属 187 个属的微孢子虫(Vávra and Lukeš, 2013)。家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis* 是 Carl Naggli 在 1857 年鉴定的第一种微孢子虫(Becnel *et al*., 2005)。家蚕微孢子虫感染家蚕引起的蚕病在蚕业上称为家蚕微粒子病(pebrine),是对养蚕业最具威胁性的一种毁灭性的病害,常对蚕业生产造成严重的经济损失(Bhat *et al*., 2009)。

海藻糖为二糖类碳水化合物,广泛存在于各种生物包括细菌、真菌、昆虫、无脊椎动物以及低等和高等植物中(Elbein, 1974; Wingler, 2002; Elbein *et al*., 2003; Frison *et al*., 2007)。海藻糖首先是被作为能量储存分子提出的。在许多昆虫中,海藻糖提供了一种易于移动的能量储备,在飞行过程中被利用(Becker *et al*., 1996)。另外,在真菌孢子中海藻糖作为能量储备,孢子发芽时伴有海藻糖的水解(Rousseau *et al*., 1972; Thevelein *et al*., 1982)。在分枝杆菌和棒状杆菌中,海藻糖作为许多细胞壁糖脂的结构组成部分发挥作用。在结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* 中,细胞壁"脐带因子"6,6-二霉菌酸海藻糖(trehalose 6,6-dimycolate)对药物和多肽都具有不渗透性。通过在这些分子周围形成类似玻璃的结构,它们可以防止脱水和氧化造成的损伤(Elbein *et al*., 2003; Tournu *et al*., 2013)。海藻糖酶(trehalase)是一种糖苷酶,可催化一分子海藻糖水解为两分子葡萄糖。家蚕微孢子虫具有完整的海藻糖代谢和糖酵解途径。家蚕微孢子虫海藻糖酶(*Nosema bombycis* trehalase, NbTre)基因包括 4 个拷贝,即 *NbTre*1, *NbTre*2, *NbTre*3 和 *NbTre*4(李孝良等, 2016)。目前对于家蚕微孢子虫海藻糖酶不同拷贝的功能仍不清楚。本研究对其中的 *NbTre*3 基因进行克隆并表达,通过免疫荧光、qRT-PCR 及 RNAi 技术对 NbTre3 的功能进行了初步的分析,旨在为家蚕微孢子虫发芽的分子机制及能量代谢研究提供理论依据,为家蚕微粒子病的防治提供线索。

1 材料与方法

1.1 生物材料及试剂

家蚕 *Bombyx mori* 品系 p50 和家蚕微孢子虫由本实验室培养繁殖并保存;原核表达菌及分子克隆感受态细胞菌株 BL21 购自北京全式金生物技术有限公司;PCR、限制性核酸内切酶、RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、真菌基因组 DNA 提取试剂盒为 TaKaRa 公司产品;Percoll 试剂为 GE Healthcare 公司产品;qRT-PCR 所用试剂购自 TaKaRa 公司;其他试剂配制所需药品均为分析纯。

1.2 家蚕微孢子虫的扩增与纯化

以 10^8 个孢子/mL 的成熟家蚕微孢子虫悬液浸渍新鲜桑叶(党晓群等, 2014),晾干后喂给 4 龄起蚕,8 h 后换以新鲜桑叶。待家蚕出现明显的微孢子虫感染症状时,收集病蚕,解剖取其丝腺,加入磷酸缓冲液(1 × PBS)研磨至匀浆,4 层纱布过滤,滤液经 3 000 g 离心 5 min,弃上清,经 1 × PBS 漂洗 3 次后用 1 × PBS 重悬,缓慢加入到非连续密度梯度(30%, 45%, 60%, 75% 和 90%)的 Percoll 溶液液面上,12 000 g 离心 40 min,收集底部沉淀,用 PBS 漂洗 3 次,即得纯化的家蚕微孢子虫。

1.3 家蚕微孢子虫基因组 DNA 的提取

向震荡管中加入 1 mL(10^9 个孢子/mL)纯化的微孢子虫悬液和 1 mL 酸洗玻璃珠,利用震荡式小型珠磨式组织研磨器进行研磨,震荡速度在 4 800 ~

5 500 r/min，共震荡 6 次，每次持续震荡时间为 60 s，每次震荡结束立刻将其放入冰中进行冷却。研磨结束后，冰上静止 5 min，待玻璃珠全部沉降至液面下时，将上清转移至新的离心管中。用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒，按照说明书操作程序提取家蚕微孢子虫的基因组。

1.4 重组原核表达载体的构建

根据 SilkPathDB（https://silkpathdb.swu.edu.cn/）已登录的 NbTre3（NBO-2g0093）的序列设计引物（正向引物：5′-CGCGGATCCATTCCAGTGGATCTAAATGC-3′，下划线示 *Bam*H Ⅰ 酶切位点；反向引物：5′-CCCAAGCTTTTTGACCAGTACTTCTTTGC-3′，下划线示 *Hin*dⅢ酶切位点），并以 1.3 节提取的家蚕微孢子虫基因组 DNA 为模板对 *NbTre*3 基因进行 PCR 扩增。反应体系（50 μL）：基因组 DNA 模板 1 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，Premix Taq™（TaKaRa Taq™ Version 2.0）25 μL，ddH_2O 补至 50 μL。反应条件：94℃预变性 2 min；98℃变性 10 s，59℃退火 30 s，72℃延伸 40 s，共 30 个循环；最后 72℃延伸 10 min。扩增产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

鉴定正确的扩增产物经 DNA 纯化试剂盒回收后，用 *Bam*H Ⅰ 和 *Hin*dⅢ进行双酶切，酶切产物与经同样双酶切的原核表达载体 pET28a（+）在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接反应，连接产物转化大肠杆菌 *Escherichia coli* Top 10 感受态细胞，涂布含硫酸卡那霉素的 LB 固体培养基，37℃培养过夜；挑取单克隆菌落并接种于含硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中，37℃过夜培养，用质粒提取试剂盒提取重组质粒，通过 PCR 及 *Bam*H Ⅰ 和 *Hin*dⅢ对重组质粒进行双酶切鉴定。并将阳性质粒送至上生工生物工（上海）股份有限公司进行 DNA 测序。

1.5 重组蛋白 NbTre3 的纯化

将 1.4 节测序正确的重组质粒 pET28a-*NbTre*3 转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞中，同时设 pET28a（+）载体质粒转化菌作为阴性对照，涂布于含适量硫酸卡那霉素的 LB 固体培养基上，37℃培养箱培养过夜；选择 PCR 鉴定阳性的菌落接种至 LB 液体培养基中，37℃摇床培养至其 OD_{600} 为 0.6～0.8 时，加入 IPTG（终浓度为 0.6 mmol/L），37℃摇床继续培养 6 h，离心收集细菌，用 1×PBS 洗 3 次；向样品中加入 40～60 μL 的蛋白上样缓冲液，100℃煮沸 10 min，进行 SDS-PAGE 及 Western blot（兔抗 6×His tag 作为一抗）鉴定；鉴定正确的菌体，冰上超声破碎（功率 50 W，超声 6 s，间隔 6 s，次数 50 次），12 000 g 4℃离心 10 min，将上清转移至新的离心管中，沉淀用少量的 1×PBS 重悬后加入 40 mL 20 mmol/L Binding Buffer 混匀，4℃孵育过夜，次日按照 Ni 柱蛋白纯化说明书对重组 NbTre3 进行纯化，并通过 SDS-PAGE 对纯化的蛋白进行鉴定。

1.6 NbTre3 多克隆抗体的制备

1.5 节纯化的重组蛋白 NbTre3 经过不同尿素含量（6，4，2 和 0 mol/L）的透析液处理后，采用 BCA 法对其浓度进行测定。然后委托金斯瑞生物科技有限公司利用获得的 NbTre3 免疫新西兰兔，进行多克隆抗体的制备。通过 ELISA 及 Western blot 对制备的多克隆抗体的效价和特异性分别进行评估。

1.7 NbTre3 的免疫荧光定位

纯化的家蚕微孢子虫用 4% 的多聚甲醛固定 15 min；PBST 浸洗玻片后用 Triton X-100 室温通透 20 min，PBST 浸洗玻片后在玻片上滴加正常山羊血清，室温封闭 30 min；每张玻片滴加足够量（1∶200 稀释）的重组 NbTre3 多克隆抗体，放入湿盒，4℃孵育过夜；PBST 洗玻片，滴加 1∶1 000（v/v）稀释好的 Alexa Fluor 488 标记的荧光二抗（生工生物工程（上海）股份有限公司），湿盒中室温孵育 1 h；PBST 浸洗玻片，滴加 DAPI 避光孵育 5 min，对标本进行染核，PBST 洗去多余的 DAPI；用含抗荧光淬灭剂的封片液封片，然后在荧光显微镜下观察并采集图像。

1.8 qRT-PCR 检测家蚕微孢子虫感染后家蚕 5 龄起蚕中肠中 *NbTre*3 的表达水平

5 龄起蚕喂以涂抹 10^8 个孢子/mL 的家蚕微孢子虫悬液的新鲜桑叶 2 h，分别在感染（喂食微孢子虫）2，6，12，24，48，72，96，120 和 144 h 剖取家蚕中肠组织；每时间点每 6 头家蚕为一组，每组为一个重复，共设 4 个重复。液氮研磨，加入 TRIzol 试剂，按照试剂盒说明书提取中肠组织总 RNA，DNase Ⅰ 室温消化 15 min 去除基因组 DNA，经反转录成 cDNA 为模板，以家蚕微孢子虫 *β-tubulin* 为内参基因，利用 qRT-PCR 检测 *NbTre*3 基因的转录水平，引物如表 1 所示。反应体系（20 μL）：TB Green Premix Ex Taq Ⅱ 10 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.8 μL，ROX Reference Dye 0.4 μL，cDNA 模板 2 μL，灭菌水补至 20 μL。每个样品设置 4 个重复孔。反应程序：95℃预变性 30 s；95℃变性 15 s，60℃退火及延伸 31 s，反应共 40 个循环。

1.9 *NbTre*3 基因的 RNAi 实验

根据 *NbTre*3 基因的序列设计了 3 条特异性的

siRNA(siRNA-1, siRNA-2 和 siRNA-3),设绿色荧光蛋白基因 *gfp* siRNA 作为阴性对照(NC)(表2),委托生工生物工程(上海)有限公司进行合成。5 龄起蚕喂以涂有 10^8 个孢子/mL 的家蚕微孢子虫悬液的桑叶,感染 6 h 后皮下注射 siRNA(1 μg/蚕),分别在注射后 24, 48 和 72 h 剖取中肠组织,每个时间点取 6 头家蚕,提取总 RNA,并反转录为 cDNA,以家蚕微孢子虫 *β-tubulin* 为内参基因,qRT-PCR 检测 *NbTre*3 基因的转录水平;同时以家蚕 *actin*3 为内参基因,利用 qRT-PCR 检测家蚕微孢子虫 16S rRNA 的转录水平,引物序列见表2。反应体系:TB Green Premix Ex Taq II 10 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.8 μL, ROX Reference Dye 0.4 μL, cDNA 模板 2 μL, 灭菌水补至 20 μL。反应程序:95℃预变性 30 s; 95℃变性 15 s, 60℃退火及延伸 31 s, 反应共 40 个循环。独立重复实验 3 次,每个样品重复测定 4 次。另外,在 siRNA 干扰 *NbTre*3 基因表达后 120 h,每处理取 10 头家蚕 5 龄起蚕,剖取中肠组织研磨后在显微镜下观察微孢子虫的数量。

1.10 数据分析

qRT-PCR 结果数据根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行计算分析(Livak and Schmittgen, 2001),并用 IBM SPSS Statistics 20 软件进行比较均值单因素方差分析(ANOVA)。

表1 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers for qRT-PCR

引物 Primer	正向引物序列 (5′-3′) Sense primer sequence	反向引物序列(5′-3′) Antisense primer sequence
qNbTre3	GGCUGAGCUUAACAGAGAATT	UUCUCUGUUAAGCUCAGCCTT
q16S rRNA	GGCCACUCCAUGUUCAGAUTT	AUCUGAACAUGGAGUGGCCTT
qβ-tubulin	GGACAAACGGAACUACGUUTT	AACGUAGUUCCGUUUGUCCTT
qActin3	GCCGAAUCAUCGAGUAAGATT	UCUUACUCGAUGAUUCGGCTT

表2 siRNA 序列

Table 2 Sequences of siRNA

siRNA	正向 Sense (5′-3′)	反向 Antisense (5′-3′)
siRNA-1	GGCUGAGCUUAACAGAGAATT	UUCUCUGUUAAGCUCAGCCTT
siRNA-2	GGCCACUCCAUGUUCAGAUTT	AUCUGAACAUGGAGUGGCCTT
siRNA-3	GGACAAACGGAACUACGUUTT	AACGUAGUUCCGUUUGUCCTT
siRNA-*gfp*	GCCGAAUCAUCGAGUAAGATT	UCUUACUCGAUGAUUCGGCTT

2 结果

2.1 重组 NbTre3 蛋白在大肠杆菌中的表达

为了构建 NbTre3 的重组原核表达载体,首先通过 PCR 对 *NbTre*3 基因进行扩增,结果如图1(A)所示,获得了一条长约 800 bp 的特异性条带,与理论长度 804 bp 相符。然后,PCR 产物经纯化和双酶切后连接 pET28a(+)载体获得重组质粒,PCR 及双酶切鉴定均获得一条大小为 800 bp 左右的特异性条带(图1: B, C),经 DNA 测序验证,结果表明重组原核表达载体 pET28a-*NbTre*3 构建成功。

将上述重组载体 pET28a-*NbTre*3 转化 BL21 感受态细胞,经 IPTG 诱导表达后,收集表达细菌,利用 SDS-PAGE(图2: A)及 Western blot(图2: B)检测均发现一条特异性的蛋白条带,其分子量大小约为 34 kD,与 NbTre3 蛋白理论分子量大小接近,结果表明重组蛋白 NbTre3 得以成功表达。

2.2 重组蛋白 NbTre3 多克隆抗体

SDS-PAGE 鉴定结果如图3所示,在用尿素含量分别为 150 mmol/L 和 200 mmol/L 的洗脱液进行洗脱时,均可获得较纯的 NbTre3 蛋白;然后,进行透析以除去尿素等成分,通过 SDS-PAGE 再次检测蛋白的纯度,结果发现仍只有一条特异性蛋白条带(图4: A)。说明透析过程中没有蛋白的降解和杂蛋白的掺入。以纯化的重组蛋白 NbTre3 为抗原免疫新西兰兔制备抗体,Western blot 检测结果如图4(B)所示,发现一条分子量大小约为 34 kD 的特异性条带,说明制备的多克隆抗体特异性较好,可用于后续实验。

2.3 NbTre3 在家蚕微孢子虫成熟孢子中的亚细胞定位

利用制备的抗 NbTre3 的多克隆抗体为一抗,Alexa Fluor 488 标记的荧光二抗,通过间接免疫荧

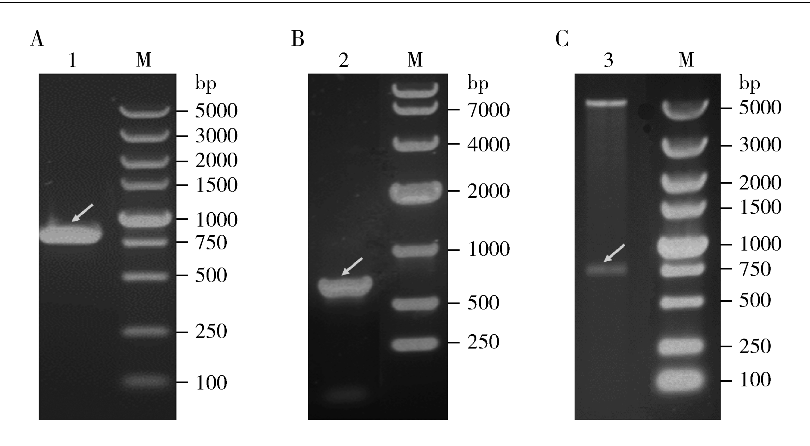


图 1　原核表达载体 pET28a-*NbTre*3 的构建

Fig. 1　Identification of the prokaryotic expression vector pET28a-*NbTre*3

A：从家蚕微孢子虫基因组中 PCR 扩增 *NbTre*3 基因 *NbTre*3 gene amplified from *Nosema bombycis* genome by PCR；B：pET28a-*NbTre*3 的 PCR 鉴定 PCR identification of pET28a-*NbTre*3；C：pET28a-*NbTre*3 的酶切鉴定 Digestion identification of pET28a-*NbTre*3；1：*NbTre*3 的 PCR 产物 PCR product of *NbTre*3；2：pET28a-*NbTre*3 的 PCR 产物 PCR product of pET28a-*NbTre*3；3：pET28a-*NbTre*3 酶切结果 Restriction digestion result of pET28a-*NbTre*3；M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker. 箭头指示目的基因 *NbTre*3。Arrows show the target gene *NbTre*3.

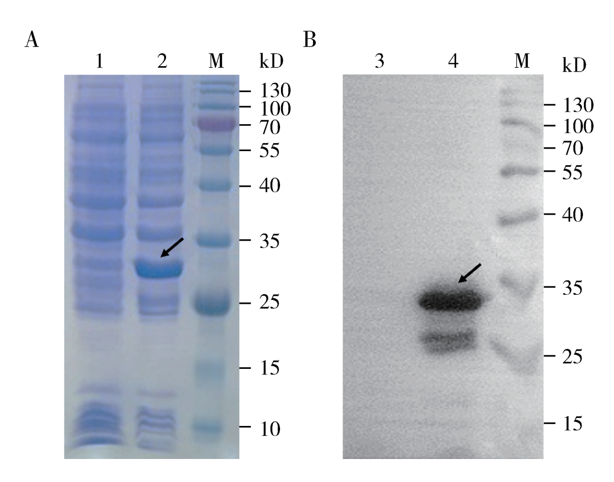


图 2　重组蛋白 NbTre3 的 SDS-PAGE(A)及 Western blot(B)鉴定

Fig. 2　Identification of the recombinant protein NbTre3 by using SDS-PAGE (A) and Western blot (B)

1，3：转化 pET28a(+)的菌液蛋白 pET28a(+) transformed bacteria solution protein；2，4：转化 pET28a-*NbTre*3 的菌液蛋白 pET28a-*NbTre*3 transformed bacteria solution protein；M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker. 箭头指示目的蛋白 rNbTre3。Arrows show the target protein rNbTre3.

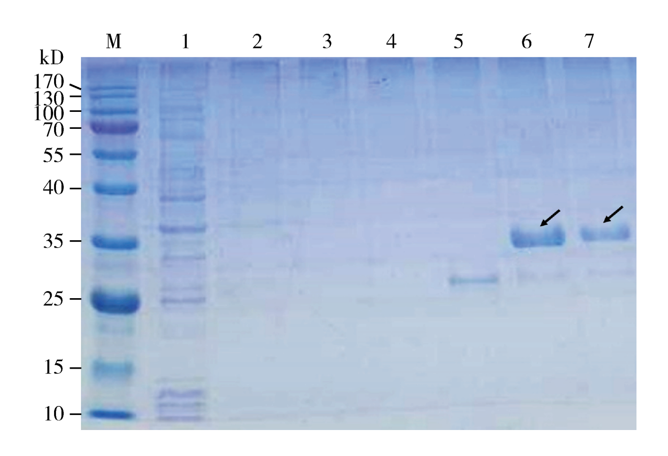


图 3　SDS-PAGE 检测纯化的重组蛋白 NbTre3

Fig. 3　SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein NbTre3

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1－7：分别为 binding buffer，binding buffer 以及 20，50，100，150 和 200 mmol/L 不同尿素含量的蛋白洗脱液 Protein elute with binding buffer，binding buffer，and 20，50，100，150 and 200 mmol/L urea，respectively. 箭头指示目的蛋白。Arrows show the target protein.

光对家蚕微孢子虫成熟孢子中 NbTre3 的分布进行了检测。结果如图 5 所示，NbTre3 主要分布在孢原质中。

2.4　微孢子虫感染后不同时间 NbTre3 在家蚕中肠细胞中的表达谱

为了探索 NbTre3 在微孢子虫不同发育时期所发挥的作用，qRT-PCR 检测 *NbTre*3 在家蚕 5 龄起蚕被微孢子虫后不同时间点中肠组织中的相对表达水平，结果如图 6 所示，*NbTre*3 在感染 6 h 的相对表达量最高，其余时间均保持在较低的水平。

2.5　RNAi 下调 *NbTre*3 基因的表达

与对照组(NC)相比，siRNA-2 对 *NbTre*3 基因表达的抑制效果最明显(图 7：A)；然而，*NbTre*3 表达被抑制的同时，家蚕微孢子虫 16S rRNA 的转录水平并没有明显的变化(图 7：B)，此外，在 siRNA 干扰 *NbTre*3 基因表达后 120 h 我们剖取中肠组织研磨后在显微镜下观察，发现实验组和对照组微孢子虫的数量无明显差异(数据未显示)，表明干扰 *NbTre*3 基因的表达对于家蚕微孢子虫的复制并没有明显的抑制作用。

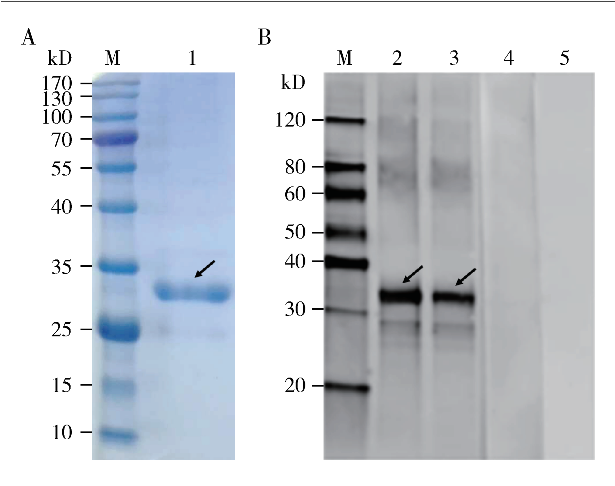


图 4 透析除盐后的重组蛋白 NbTre3 的 SDS-PAGE 分析(A)及其多克隆抗体的 Western blot 鉴定(B)

Fig. 4 Identification of the desalinated recombinant protein NbTre3 by SDS-PAGE (A) and its polyclonal antibody by Western blotting (B)

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 透析除盐后的重组蛋白 NbTre3 Desalinated recombinant protein NbTre3; 2, 3: NbTre3 多克隆抗体 Polyclonal antibody of NbTre3; 4: 免疫前血清 Pre-immuned serum; 5: PBS. 箭头指示目的蛋白。Arrows show the target protein.

3 讨论

微孢子虫的生活史可分为 3 个阶段,即感染期、裂殖增殖期和孢子形成期(Vávra, 1976)。感染期即孢子发芽期,家蚕食下被微孢子虫污染的桑叶后,孢子在消化道内被活化,孢内渗透压增大,大量水分子进入细胞,随后极质体和后极泡吸水膨胀压迫极丝快速外翻弹出刺入寄主细胞,同时孢原质在极丝弹出前被吸入极丝内,最后具有感染性的孢原质通过中空的极丝注入寄主细胞(Wingler, 2002),即完成孢子发芽过程。关于孢子发芽的分子机制有两种假说,一种假设认为孢子壁上存在特殊的跨膜水通道,水通道蛋白可以特异性地使水分子快速通过孢子壁,使孢内压力增大,引发孢子发芽(Frixione *et al.*, 1992, 1997; Ghosh *et al.*, 2006)。另一种假设认为,在微孢子虫发芽过程中伴随有孢内海藻糖含量降低而葡萄糖含量升高的现象,孢内海藻糖降解为葡萄糖是引起孢内压力增大的重要原因(Vandermeer and Gochnauer, 1971; Undeen,

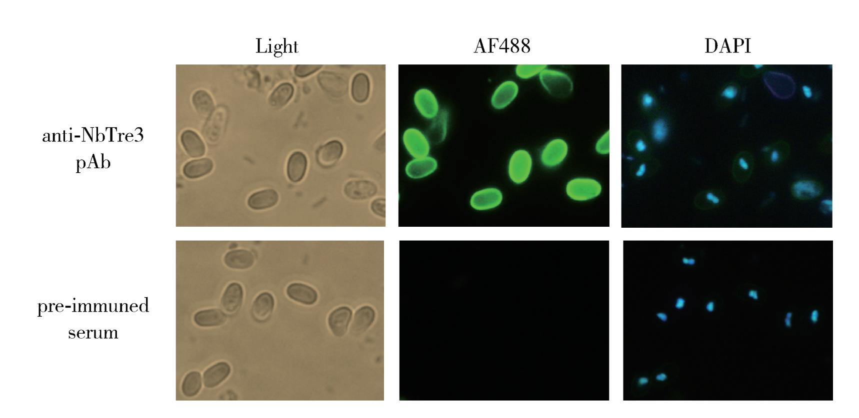


图 5 间接免疫荧光检测 NbTre3 在家蚕微孢子虫成熟孢子中的定位

Fig. 5 Localization of NbTre3 in mature spore of *Nosema bombycis* detected by indirect immunofluorescence assay

Light: 明视野 Bright field; AF488: 显示绿色荧光抗体标记的目的蛋白分布 Showing the distribution of the target protein labeled with green fluorescent antibody; DAPI: 显示被 DAP 荧光 I 染料标记的核 Showing the nuclei labeled with DAPI fluorescent dye. 孢子经固定和透化后和 NbTre3 多克隆抗体(anti-NbTre3 pAb)或免疫前血清(pre-immuned serum)进行孵育,然后孢子被洗过后和 AF488 标记羊抗兔二抗进行孵育,最后核酸用 DAPI 进行标记。After fixation and permeabilization, the spores were incubated either with anti-NbTre3 pAb or pre-immuned serum. And then the spores were washed and incubated with secondary antibody AF488 labeled goat anti-rabbit IgG (H + L) antibody. Finally, the DAPI was used to label the nuclei of spores.

1990)。也有研究分析表明,细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化是水流入的一个原因(Huang *et al.*, 2018)。外界刺激因素改变孢壁通透性后,使孢内膜结构上起骨架支撑作用的 Ca^{2+} 与外界离子竞争结合位点并被置换下来,引起孢膜结构改变,由于间隔膜被打破,海藻糖与海藻糖酶相互接触,大量降解为葡萄糖,孢内渗透压升高,促使水分进入孢内。

本研究通过原核表达及蛋白纯化,制备了抗 rNbTre3 的多克隆抗体,Western blot 检测结果正确(图 4: B),在小于 30 kD 大小处有不太明显的非特异性条带出现,分析原因可能是由于抗原蛋白降解或断裂造成的。间接免疫荧光结果显示,在家蚕微

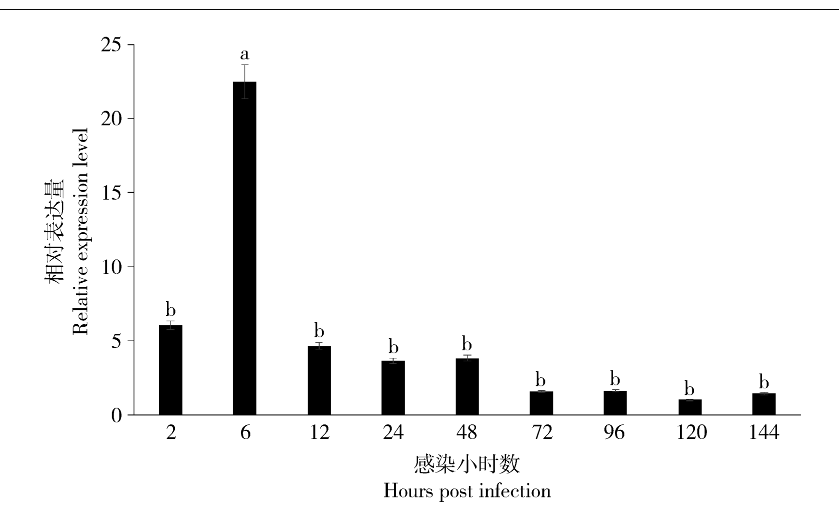


图 6　qRT-PCR 检测家蚕微孢子虫感染后不同时间 *NbTre*3 在家蚕 5 龄起蚕中肠中的表达谱

Fig. 6　Expression profiles of *NbTre*3 in the midgut of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* at different time post infection of *Nosema bombycis* detected by qRT-PCR

柱上不同小写字母分别代表不同感染时间点家蚕中肠中 *NbTre*3 基因表达量的差异显著性(n = 4)($P < 0.05$, ANOVA)。Different lowercase letters above bars represent the significant differences (n = 4) in the *NbTre*3 gene expression level in the midgut of silkworm at different infection time points ($P < 0.05$, ANOVA).

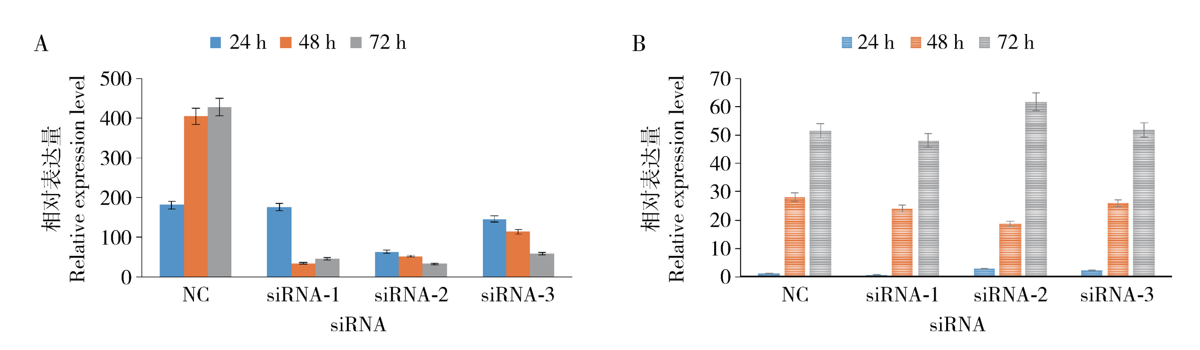


图 7　RNAi 后家蚕 5 龄起蚕中肠中 *NbTre*3(A)及 16S rRNA(B)转录水平

Fig. 7　Transcription levels of *NbTre*3 (A) and 16S rRNA (B) in the midgut of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* after RNA interference

NC: *gfp* siRNA; siRNA-1 -3: *NbTre*3 siRNAs. 图中数据为平均值 ± 标准误。Data in the figure are mean ± *SE*.

孢子虫成熟孢子中,NbTre3 主要分布在孢原质中(图 5)。*NbTre*3 基因表达谱分析结果表明,*NbTre*3 在家蚕微孢子虫感染家蚕初期(6 h)相对表达水平最高(图 6),推测 NbTre3 在家蚕微孢子虫发芽过程中发挥重要的作用(Vandermeer and Gochnauer, 1971; Undeen, 1990)。利用 RNAi 技术对 *NbTre*3 的表达达到了显著的抑制效果,但微孢子虫 16S rRNA 的转录水平并没有受到明显的抑制(图 7),进一步表明 NbTre3 在家蚕微孢子虫侵染初期的发芽过程中发挥重要作用。

孢原质进入寄主细胞后,以二分裂或多分裂的方式发育成裂殖体,裂殖体增殖到一定阶段细胞膜变厚,形成母孢子,母孢子以二分裂的方式形成孢子母细胞,再由孢子母细胞发育成成熟孢子。微孢子虫的感染以及快速增殖是依赖于 ATP 的能量密集型的过程。但这些能量来源于哪里,是怎么产生的,目前尚未完全明确。Huang 等(2018)利用 RNAi 技术下调分泌型家蚕微孢子虫己糖激酶(*Nosema bombycis* hexokinase, NbHK)的表达,可以有效抑制家蚕微孢子虫的增殖,表达谱分析结果显示分泌型 NbHK 可能在家蚕微孢子虫的增殖期发挥重要作用。本研究通过 qRT-PCR 对微孢子虫感染不同时间的家蚕 5 龄起蚕中肠组织中 *NbTre*3 基因的转录水平进行分析,发现 *NbTre*3 仅在感染初期高表达(图 6),在裂殖增殖期和孢子形成期相对表达量均不高,RNAi 对 16S rRNA 的转录活性没有显著影响(图 7),表明 NbTre3 主要与孢子发芽和侵染有关。对于其他 3 个拷贝的海藻糖酶 NbTre1, NbTre2 和

NbTre4 在家蚕微孢子虫的发芽或增殖期的能量供应是否发挥作用还有待于进一步的研究。

参考文献（References）

Becker A, Schlöder P, Steele JE, Wegener G, 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*, 52(5): 433–439.

Becnel JJ, White SE, Shapir OAM, 2005. Review of microsporidia-mosquito relationships: from the simple to the complex. *Folia Parasitol.*, 52(1/2): 41–50.

Bhat SA, Bashir I, Kamili AS, 2009. Microsporidiosis of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera-Bombycidae): a review. *Afr. J. Agric. Res.*, 4(11): 1519–1523.

Dang XQ, Lin LP, Li CF, Pan GQ, Li T, Long MX, Zhou ZY, 2014. Prokaryotic expression and subcellular localization of ADP/ATP carrier protein in microsporidian *Nosema bombycis*. *Acta Entomol. Sin.*, 57(3): 300–307. [党晓群, 林立鹏, 李春峰, 潘国庆, 李田, 龙梦娴, 周泽扬, 2014. 家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白的原核表达及间接免疫荧光定位分析. 昆虫学报, 57(3): 300–307]

Elbein AD, 1974. The metabolism of α,α-trehalose. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.*, 30: 227–256.

Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D, 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4): 17R–27R.

Frison M, Parrou JL, Guillaumot D, Masquelier D, François J, Chaumont F, Batoko H, 2007. The *Arabidopsis thaliana* trehalase is a plasma membrane-bound enzyme with extracellular activity. *FEBS Lett.*, 581(21): 4010–4016.

Frixione E, Ruiz L, Cerbón J, Undeen AH, 1997. Germination of *Nosema algerae* (Microspora) spores: conditional inhibition by D_2O, ethanol and Hg^{2+} suggests dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 44(2): 109–116.

Frixione E, Ruiz L, Santillán M, de Vargas LV, Tejero JM, Undeen AH, 1992. Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell Motil. Cytoskel.*, 22(1): 38–50.

Ghosh K, Cappiello CD, McBride SM, Occi JL, Cali A, Takvorian PM, McDonald TV, Weiss LM, 2006. Functional characterization of a putative aquaporin from *Encephalitozoon cuniculi*, a microsporidia pathogenic to humans. *Int. J. Parasitol.*, 36(1): 57–62.

Huang Y, Zheng S, Mei X, Yu B, Sun B, Li B, Wei J, Chen J, Li T, Pan G, Zhou Z, Li C, 2018. A secretory hexokinase plays an active role in the proliferation of *Nosema bombycis*. *PeerJ.*, 6: e5658.

Li XL, Peng XR, Chen G, Dai WJ, Tang XD, Xu L, Shen ZY, 2016. Bioinformatic analysis, prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of *Nosema bombycis* trehalase gene. *Sci. Seric.*, 42(6): 88–96. [李孝良, 彭祥然, 陈功, 戴卫江, 唐旭东, 徐莉, 沈中元, 2016. 家蚕微孢子虫海藻糖酶(Trehalase)基因的生物信息学分析及原核表达和多克隆抗体制备. 蚕业科学, 42(6): 88–96]

Liu JP, Zeng L, 2006. An overview of research on the microsporidian biodiversity. *Chin. Bull. Entomol.*, 43(2): 153–158. [刘吉平, 曾玲, 2006. 微孢子虫生物多样性研究的述评. 昆虫知识, 43(2): 153–158]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Mathis A, 2000. Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *Int. J. Parasitol.*, 30(7): 795–804.

Rousseau P, Halvorson HO, Bulla LA, Julian GS, 1972. Germination and outgrowth of single spores of *Saccharomyces cerevisiae* viewed by scanning electron and phase-contrast microscopy. *J. Bacteriol.*, 109(3): 1232–1238.

Thevelein JM, den Hollander JA, Shulman RG, 1982. Changes in the activity and properties of trehalase during early germination of yeast ascospores: correlation with trehalose breakdown as studied by *in vivo* ^{13}C NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79(11): 3503–3507.

Tournu H, Fiori A, Van Dijck P, 2013. Relevance of trehalose in pathogenicity: some general rules, yet many exceptions. *PLoS Pathog.*, 9(8): e1003447.

Undeen AH, 1990. A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa, Microspora) spores. *J. Theor. Biol.*, 142: 223–235.

Vandermeer JW, Gochnauer TA, 1971. Trehalase activity associated with spores of *Nosema apis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 17: 38–41.

Vávra J, 1976. The development of microsporidia. In: Bulla LAJr, Cheng TC eds. Comparative Pathobiology. Plenum Press, New York. 87–110.

Vávra J, Lukeš J, 2013. Microsporidia and "the art of living together". *Adv. Parasitol.*, 82: 253–319.

Wingler A, 2002. The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry*, 60(5): 437–440.

（责任编辑：马丽萍）